

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 53–59

Die Ultraviolett-Absorption von Kreatinin und Glykocyamidin im Vergleich mit anderen Guanidinverbindungen und analogen Hydantoinen

Von H. H. Berlet und A. Völkl

Institut für Pathochemie und Allgemeine Neurochemie (Direktor: Prof. Dr. G. Quadbeck) der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 2. Sept. 1974)

Herrn Prof. Dr. Dr. V. Klingmüller zum 65. Geburtstag gewidmet

Kreatinin und Glykocyamidin weisen im Ultravioletten zwei Absorptionsbanden auf, die der Guanidin- bzw. Säureamidgruppe als Chromophore zuzuschreiben sind. Azyklische Guanidin- und analoge Hydantoinverbindungen zeigen dagegen nur eine einzige, allerdings asymmetrische Absorptionsbande. Anhand der Absorptionsspektren und ihrer Veränderungen in Abhängigkeit von pH und Ionenstärke im Lösungsmedium ist es möglich, Guanidinverbindungen spezifischer als bisher zu identifizieren und den Dissoziationsgrad der basischen Guanidgruppe sowie den bevorzugten Tautomeriezustand der Säureamidbindung von Kreatinin und Glykocyamidin spektralphotometrisch zu beurteilen.

The ultraviolet absorption of creatinine and glycohydantoin compared with that of other guanidine compounds and hydantoin analogs

Creatinine and glycohydantoin exhibit two distinct absorption bands of different intensity in the ultraviolet spectral region; in measuring aqueous solutions of creatinine maximum absorptions were found at wavelengths of 201 and 233 nm, respectively, the molar extinction coefficients being $12.4 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ and $6.7 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. The corresponding values for glycohydantoin were 196 and 222 nm, and $6.0 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ and $3.3 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Aliphatic guanidines as well as the hydantoin analogs of creatinine and glycohydantoin, i.e. hydantoin and 1-methylhydantoin all gave only one detectable, though asymmetric absorption band of lower intensity. It was concluded that the guanidine group and the acid amide moiety of creatinine and glycohydantoin are rendered distinguishable as two distinct chromophores by ring closure only. Changes in the pH of aqueous solutions, or increased ionic strength resulted in characteristic changes in the intensities of the stronger absorption bands mainly of creatinine and glycohydantoin. Through their characteristic absorption spectra it is thus possible to both identify cyclic guanidines more specifically than previously, and to estimate the dissociation of the basic guanidine moiety as well as the preferred tautomeric state of the acid amide bond of creatinine and glycohydantoin.

Nach Grinbaum & Marchlewski (1) sowie Gaede & Grüttner (2) absorbiert Kreatinin in wässriger Lösung ultraviolettes Licht mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 233–235 nm. Wollenberger (3) bestätigte diese Beobachtungen und fand in einem pH-Bereich von 6,5–12,3 für Kreatinin eine molare Extinktion (ϵ) von $6,9 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Die Messungen dieser Untersucher beschränkten sich allerdings auf den ultravioletten Bereich von etwa 300–210 nm und geben keinen Aufschluß über den Verlauf des Absorptionsspektrums von Kreatinin bei noch kürzeren Wellenlängen.

Bei einer Nachprüfung dieser Ergebnisse mit der Möglichkeit, das Spektrum bis zu einer Wellenlänge von 190 nm aufzuzeichnen, zeigte sich, daß Kreatinin zwischen 200 und 220 nm eine zweite Absorptionsbande aufweist (4). Hier soll über Versuche berichtet werden, durch einen Vergleich der Absorption verschiedener

Guanidin- und Hydantoinverbindungen in diesem spektralen Bereich den Chromophor zu identifizieren, der für diese Absorptionsbande verantwortlich ist. In ähnlicher struktureller Beziehung wie Kreatinin zu Kreatin steht Glykocyamidin zu Glykocyamin. Das Absorptionsspektrum von Glykocyamidin und seine Veränderungen unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wurden deswegen ebenfalls untersucht.

Material und Methoden

Die wässrigen Lösungen für die spektralen Messungen wurden mit analysereinen Substanzen (Harnstoff, Kreatin und Kreatinin, Fa. Merck; Arginin, freie Base, Serva; Guanidinhydrochlorid, Methylguanidin-hydrochlorid, Glykocyamin, Hydantoin, Hydantoin und 5-Methylhydantoin, Fluka; Kreatinphosphat, Boehringer Mannheim) ohne weitere Reinigung jeweils frisch in doppelt Quarz-destilliertem Wasser angesetzt. N₁-Methylhydantoin wurde von Sarkosinäthylester (Schuchardt) und

Kaliumcyanat ausgehend nach Standardmethoden hergestellt (5) und durch Umkristallisation aus Äthanol/H₂O gereinigt. Glykocyamidin wurde aus Glykocyamin gewonnen. Eine 20 g/l wässrige Lösung von Glykocyamin wurde dazu mit verd. HCl auf pH 2 eingestellt, in ein Glasrohr eingeschmolzen und 20 Stunden auf 100–105 °C erhitzt. Aus der Abnahme des kolorimetrisch gemessenen Glykocyamins (6) ergab sich unter Berücksichtigung des Chloridgehaltes eine Ausbeute von 55–60 %. Die weitere Reinigung erfolgte dünnschichtchromatographisch auf präparativen Kieselgelplatten (200 × 200 mm, 2 mm Schichtdicke, Merck AG) mit Chloroform-Methanol-17 % Ammoniak (Volumina 40 ml + 40 ml + 20 ml) als Laufmittel (7). Auf einer Platte konnten bis zu 100 mg Substanz bei einer Laufstrecke von 150–180 mm und zweimaliger Chromatographie mit dem gleichen Laufmittel scharf getrennt werden. Der Glykocyamidin-haltige Bereich der Platte wurde durch Besprühen der Randzonen mit einem Reagenz aus Pentacyanonitrosylferrat-[II]Kaliumhexacyanoferrat-[III]-Natronlauge (8) kenntlich gemacht, von der Platte abgetragen, in einem Mörser pulverisiert und trocken in eine Glassäule (15 × 150 mm) gefüllt und mit einem Gemisch von Chloroform-Methanol (Volumina, 10 ml + 10 ml) eluiert. Die Reinheit des Präparates wurde dünnschichtchromatographisch verifiziert; bei der Bestimmung des FP zerfällt die Substanz oberhalb von 180 °C unter zunehmender Verfärbung. Die Absorptionsspektren wurden mit Hilfe eines registrierenden Doppelstrahlphotometers Perkin-Elmer 124 von 190 bis 300 nm bei einem konstanten Spalt von 1,0 nm aufgezeichnet. Die Verwendung einer Stickstoffatmosphäre im optischen Meßraum des Gerätes erwies sich als nicht notwendig. Die Schichtlänge der Küvetten betrug einheitlich 1 cm, die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Kreatinin und Glykocyamidin wurden einheitlich in einer Konzentration von 0,1 mmol/l, die übrigen Substanzen in einer Konzentration von 1,0 mmol/l, in H₂O gelöst, das bis etwa 190 nm ausreichend durchlässig ist (9). Die Einstellung der pH-Werte erfolgte elektrometrisch unter Verwendung von verdünnter HCl bzw. NaOH, denen zur Vermeidung von Verdünnungseffekten die betreffenden Substanzen in einer zur Ausgangslösung äquimolaren Konzentration zugesetzt waren. Weitere methodische Einzelheiten sind im Text erwähnt.

Ergebnisse

UV-Absorption von Kreatinin und anderen Guanidinen

Abbildung 1 zeigt die UV-Absorptionsspektren von Kreatinin, Kreatin und Glykocyamin. Kreatinin weist in wässr. Lösung zwei Absorptionsbanden auf; neben der Bande bei 233 nm (im folgenden Bande B genannt) besteht bei 201 nm ein zweites, sehr viel intensiveres λ_{\max} , als Bande A im folgenden bezeichnet. Dazwischen liegt ein λ_{\min} bei 216 nm. Die molaren Extinktionen (ϵ) bei λ_{\max} erreichen Werte von $12,35 \times 10^6$ und $6,68 \times 10^6$ cm²/mol. Die azyklischen Guanidine Glykocyamin und Kreatin absorbieren ebenfalls im Ultraviolett mit λ_{\max} von 201 bzw. 208 nm; die Werte für ϵ sind mit $1,36 \times 10^6$ und $1,61 \times 10^6$ cm²/mol deutlich niedriger als die der zyklischen Analoga Kreatinin und Glykocyamidin (s.u.). Bei den Spektren ist zu berücksichtigen, daß die wässr. Meßlösungen dieser Substanzen unterschiedliche pH-Werte aufwiesen; Kreatinin ein pH von 6,3, Kreatin und Glykocyamin jeweils ein pH von 3,4.

Diese und einige andere Guanidinderivate wurden zum pH-Ausgleich in einer wässr. 0,01 mol/l Ammoniaklösung gelöst und auf diese Weise auf einen einheitlichen pH-Bereich von etwa 10 gebracht, der für die spektralen

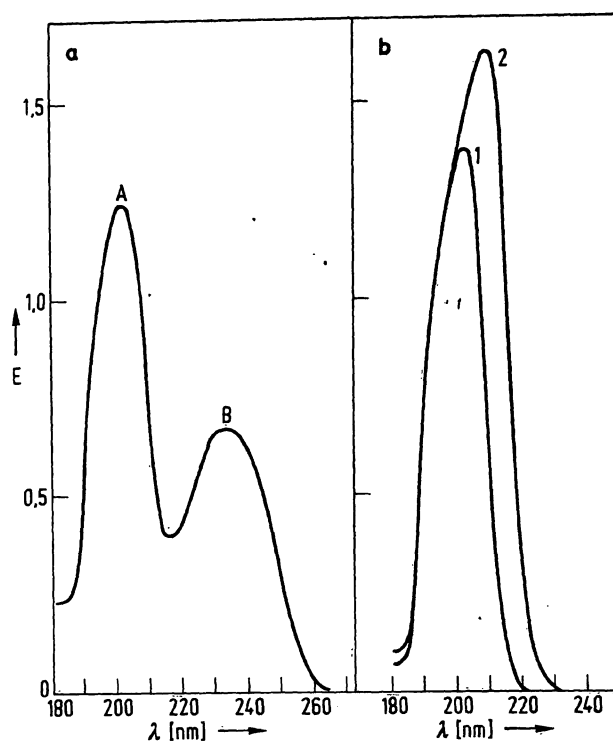


Abb. 1. Absorptionsspektren von a) Kreatinin, 0,1 mmol/l in bidest. Wasser, und von b) Glykocyamin (1) und Kreatin (2), jeweils 1,0 mmol/l in bidest. Wasser.

Tab. 1. Lage und Intensität der Absorptionsmaxima von Kreatinin im Vergleich mit Glykocyamidin und einigen anderen nicht-zyklischen Guanidinverbindungen.

Kreatinin und Glykocyamidin wurden als Lösungen von 0,1 mmol/l in 0,01 mol/l NH₄OH gemessen, die übrigen Substanzen 1,0 mmol/l in 0,01 mol/l NH₄OH. Die pH-Werte der Lösungen lagen in einem Bereich zwischen 9,5–10,5.

	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	$\epsilon_{\max}(\times 10^6)$ [cm ² /mol]
Kreatinin, Bande A	202	10,24
Bande B	233	5,75
Glykocyamidin, Bande A	202	4,52
Bande B	222	3,65
Guanidin-HCl	197	0,18
Methylguanidin-HCl	203*	1,13
Glykocyamin	204	1,15
Kreatin	211	1,57
Kreatinphosphat	216	1,76
Arginin	203	1,15

* Schulter bei 214 nm.

Messungen von Kreatinin empfohlen wird (13,14). Alle aufgeführten Guanidine (Tab. 1) absorbieren im Spektralbereich von 197 bis 216 nm. Dabei verschiebt sich ausgehend vom Guanidin-HCl λ_{\max} in Abhängigkeit von der Art und Kettenlänge der Substitution mit Ausnahme von Arginin nach rot. Gleichzeitig nimmt die Absorptionsintensität unter dem Einfluß der Substituenten

(Auxochrome) zu. Nach Lage und Höhe seiner Absorptionsbande stimmt Arginin trotz der längeren Kohlenstoffkette genau mit Glykocyamin überein. Glykocyamin bietet mit zwei Banden unterschiedlicher Intensität ein dem Kreatinin sehr ähnliches Absorptionsspektrum. Die Werte für ϵ sind in wäßr. Lösung bei pH 4,9 um etwa die Hälfte niedriger als die von Kreatinin, dennoch deutlich größer als die der offenkettigen Guanidinkörper.

Einfluß von Ionenstärke und pH auf das Absorptionsspektrum von Guanidinen

Steigende Konzentrationen des in Lösung vollständig dissoziierten Salzes Natriumchlorid führten allgemein zu einer leichten Rotverschiebung und Hypochromie der Absorptionsbanden (Tab. 2). Deutlich beeinflusst wurden dabei die A-Banden von Kreatinin und Glykocyamin sowie die Absorptionsbande von Glykocyamin, während Kreatin und die B-Banden weniger stark betroffen waren. Bei der nachfolgenden Prüfung des Einflusses der H^+ -Konzentration auf die Guanidinspektren wurde deswegen eine Säure- bzw. Laugenkonzentration von 0,1 mol/l nicht überschritten.

In Abhängigkeit vom pH zeigt das Absorptionsspektrum von Kreatinin charakteristische Veränderungen (Abb. 2), die sich ähnlich der Ionenstärke vor allem auf die A-Bande auswirken. Bei pH 0,9 bzw. 12,9 ist die A-Bande nur noch als Schulter im Kurvenverlauf angedeutet. Glykocyamin reagiert auf pH-Veränderungen analog zu Kreatinin (Tab. 3a, b). Auch bei Kreatin und Glyko-

Tab. 2. Intensität und Lage der Absorptionsbanden von Glykocyamin, Kreatin, Glykocyaminid und Kreatinin in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration (NaCl) des wäßrigen Lösungsmittels. Extinktionskoeffizienten in cm^2/mol .

Substanz	Lösungsmittel		
	H ₂ O	NaCl, 0,1 mol/l	NaCl, 1,0 mol/l
<i>Glykocyamin</i>	λ_{max} 202 ϵ_{max} $1,36 \times 10^6$	206 $1,17 \times 10^6$	208 $0,94 \times 10^6$
<i>Glykocyaminid</i>			
Bande A	λ_{max} 196 ϵ_{max} $5,98 \times 10^6$	203 $4,28 \times 10^6$	207 $3,67 \times 10^6$
Bande B	λ_{max} 222 ϵ_{max} $3,30 \times 10^6$	223 $3,18 \times 10^6$	223 $3,38 \times 10^6$
<i>Kreatin</i>	λ_{max} 209 ϵ_{max} $1,61 \times 10^6$	210 $1,57 \times 10^6$	212 $1,55 \times 10^6$
<i>Kreatinin</i>			
Bande A	λ_{max} 201 ϵ_{max} $11,06 \times 10^6$	205 $10,16 \times 10^6$	207 $7,42 \times 10^6$
Bande B	λ_{max} 233 ϵ_{max} $6,20 \times 10^6$	233 $6,12 \times 10^6$	233 $6,07 \times 10^6$

cyamin tritt mit zunehmender Entfernung des pH-Wertes vom Neutralpunkt neben der Verschiebung der λ_{max} ein hypochromer Effekt auf. Zwischen Kreatin und der A-Bande von Kreatinin sowie zwischen Glykocyamin und der A-Bande von Glykocyaminid fällt eine gute

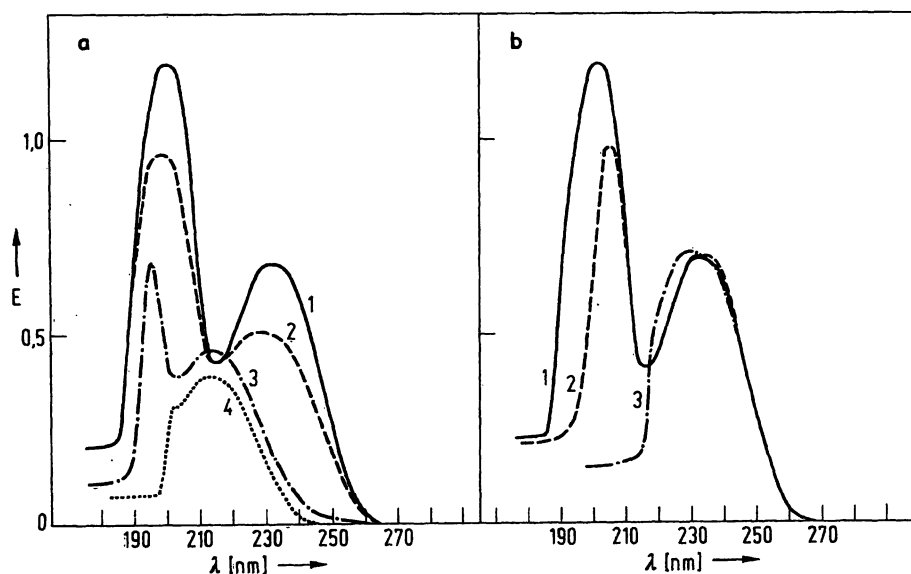


Abb. 2. Absorptionsspektren von Kreatinin, 0,1 mmol/l in bidest. Wasser, mit verdünnter HCl bzw. NaOH auf die angegebenen pH-Werte eingestellt. Referenzspektrum einer Kreatininlösung in bidest. Wasser ohne Zusätze ist die Kurve 1, Abb. 2a. Kreatinin, 0,1 mmol/l in 1,0 mol/l HCl bzw. 1,0 mol/l NaOH ergaben pH-Werte von 0,9 und 12,8.

Abb. 2a. Spektrum 1: pH 6,4 Spektrum 3: pH 3,0
Spektrum 2: pH 5,0 Spektrum 4: pH 0,9

Abb. 2b. Spektrum 1: pH 7,0 Spektrum 3: pH 12,9
Spektrum 2: pH 11,0

Tab. 3a. Lage und Höhe der Absorptionsbanden von Glykocyamin und Glykocyamidin in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung.

pH	$\lambda_{\max}(\text{nm})$		$\epsilon_{\max}(\times 10^6)$ [cm ² /mol]	
	Glykocyamin	Glykocyamidin	Glykocyamin	Glykocyamidin
	A	B	A	B
1,0	202	203	0,51	2,78
2,0	202	197*	0,82	3,70
5,0	205	196	1,08	3,30
7,0	205	199	1,10	3,81
9,0	205	199	1,07	3,94
11,0	207	204	0,82	3,84
12,0	212	212**	0,37	3,84
12,7	2,18	225	0,31	2,81

* Schulter bei 210 nm

** Schulter

Tab. 3b. Lage und Höhe der Absorptionsbanden von Kreatin und Kreatinin in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung.

pH	$\lambda_{\max}(\text{nm})$		$\epsilon_{\max}(\times 10^6)$ [cm ² /mol]	
	Kreatin	Kreatinin	Kreatin	Kreatinin
	A	B	A	B
0,9	207	202*	1,27	3,42
2,0	208	198	1,36	4,21
5,0	210	198	1,52	9,48
7,0	210	201	1,52	11,24
9,0	211	201	1,53	11,20
11,0	211	205	1,49	9,20
12,0	214	210	1,21	5,32
12,8	218	—	0,90	—

* Schulter

Übereinstimmung in der pH-abhängigen Hypochromie auf, insbesondere im pH-Bereich von 7 bis 13 (Tab. 3b).

In Abbildung 3 sind die Extinktionen der beiden λ_{\max} einer 0,1 mmol/l Kreatininlösung gegen pH-Werte von 0,9 bis 7,0 aufgetragen (s.a. Abb. 2 und Tab. 3b). Die Kurven entsprechen mit zwei Wendepunkten bei pH 2,8 und 5,0 für Bande A und einem Wendepunkt bei pH 5,3 für Bande B dem Bild von Titrationskurven. Interpretiert man die Diagramme in analoger Weise, so liegen bei den durch die Wendepunkte gegebenen pH-Werten die Chromophoren von Kreatinin jeweils zur Hälfte in einer anregbaren Form vor. Die beiden positiven Wendepunkte der Bande A sind als Ausdruck zweier anregbarer Grundzustände mit zwei verschiedenen bevorzugten Mesomeriemöglichkeiten unterschiedlicher Intensität aufzufassen, die gewissermaßen zwei „Absorptionsäquivalenten“ entsprechen. Das intensivere Äquivalent tritt zwischen pH 0,9 und 4,0 mit einem $\Delta\epsilon$ von $4,8 \times 10^6$ cm²/mol in Erscheinung, das schwächere Äquivalent zwischen pH

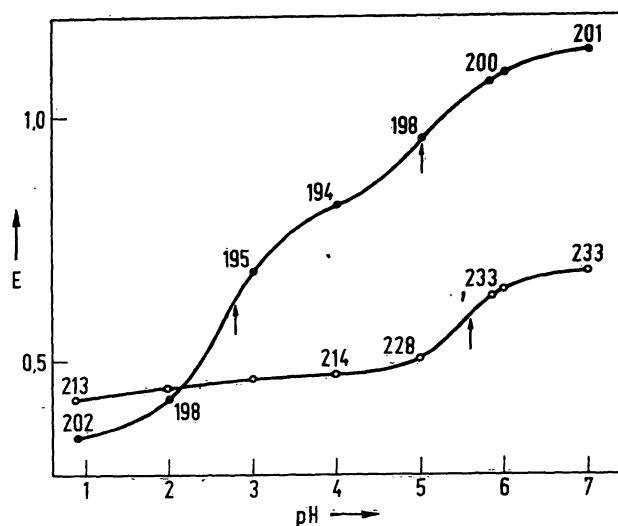


Abb. 3. Die Absorptionsmaxima der beiden Banden A (●—●) und B (○—○) von Kreatinin sind als Funktion des pH-Wertes der Meßlösung aufgetragen (s. a. Abb. 2). Die Zahlen zu den Meßwerten geben die Lage des Absorptionsmaximums (nm) an, die Pfeile die positiven Wendepunkte bei pH 2,8 und 5,0 für die Bande A und bei pH 5,3 für die Bande B (vgl. Abb. 1a).

4,0 und 7,0 mit einem $\Delta\epsilon$ von $3,0 \times 10^6$ cm²/mol. An der Kurve der Bande B fällt auf, daß der eigentlichen Absorptionszunahme mit einem Wendepunkt zwischen pH 5 und 7 eine sprunghafte bathochrome Verschiebung um 14 nm vorausgeht. Eine Rotverschiebung zusammen mit einem Anstieg der Intensität heißt jedoch, daß der Absorptionsquerschnitt des Chromophors, im Fall des Kreatinins mit den sich gegenüberstehenden Chromophoren die absolute Länge des Moleküls zugenommen haben (9).

Ein enger Zusammenhang besteht zwischen einer pH-abhängigen spektralphotometrischen und einer elektrometrischen Titrationskurve, sofern Chromophor und Protonenakzeptor bzw. -donator einer Base oder Säure miteinander identisch sind. Aufnahme oder Abgabe eines Protons, maßgeblich für die Basizität oder Azidität funktioneller Gruppen, beeinflussen im Bereich eines Chromophors die Resonanzfähigkeit von π -Elektronen und damit die Anregbarkeit eines Chromophors (10). Demnach entsprechen die spektralphotometrisch gemessenen Werte von 2,8 und 5,0 (s.o.) den Dissoziationskonstanten dieser Gruppen. Zur Überprüfung eines solchen Zusammenhanges bei Kreatinin wurde eine 50 mmol/l Kreatininlösung in 0,1 mol/l HCl mit NaOH elektrometrisch zurücktitriert; daraus ergab sich graphisch für die Dissoziation der Guanidiniumgruppe ein pK' von 4,92. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit pK' -Werten von 4,78 und 4,84 anderer Autoren (11,12). Wollenberger (3) fand spektralphotometrisch eine Dissoziationskonstante von 5,02, die sich jedoch offensichtlich auf Bande B von Kreatinin bezieht und mit dem Wert von 5,3 (s.o.) zu vergleichen ist. Zu der hier spek-

tralphotometrisch gemessenen „sauren“ Dissoziationskonstante der Bande A von 2,8 liegen keine entsprechenden elektrometrischen Titrationsergebnisse vor.

Absorptionsspektren von Hydantoinen

Für eine vergleichende Untersuchung über die Bedeutung der Iminogruppe als Chromophor der Guanidinverbindungen boten sich die Hydantoine an, die sich vom Harnstoff ableiten und bei denen an die Stelle der Iminogruppe ein Sauerstoffatom tritt. Die Zahlenwerte zur ultravioletten Absorption von Harnstoff und einiger Hydantoine sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Beim Vergleich mit den Guanidinen in Tabelle 1 lassen sich folgende Gemeinsamkeiten und Unterschiede feststellen. Die λ_{\max} der Harnstoffderivate finden sich im gleichen Spektralbereich wie die der Guanidine. Beim Ringschluß der Hydantoinensäure zum Hydantoin tritt eine Rotverschiebung von λ_{\max} auf, die der Hypsochromie bei der entsprechenden Bildung der zyklischen Guanidine bezogen auf deren A-Bande gegenübersteht. Die N_1 -Methylierung von Hydantoin bewirkt die gleiche bathochrome Verschiebung von λ_{\max} wie zwischen Glykocyamidin und Kreatinin. Dagegen führt der Ringschluß bei den Hydantoinen weder zum Auftreten von zwei voneinander abgesetzten Absorptionsbanden noch zu einer vergleichbaren Zunahme der Absorptionsintensität. Außerdem schwächt eine Zunahme der H^+ -Konzentration die Absorption der Hydantoine nur geringfügig ab, mit zunehmender Basizität des Lösungsmittels steigt die Absorptionsintensität im Gegensatz zu den Guanidinen sogar an.

Chromophore von Kreatin

Bei den Absorptionsspektren von Kreatin und Glykocyamin (Abb. 1) und anderen substituierten Guanidinen sowie auch bei den Spektren der Hydantoine (s. Tab. 4) fiel eine deutliche Asymmetrie der Banden auf, die

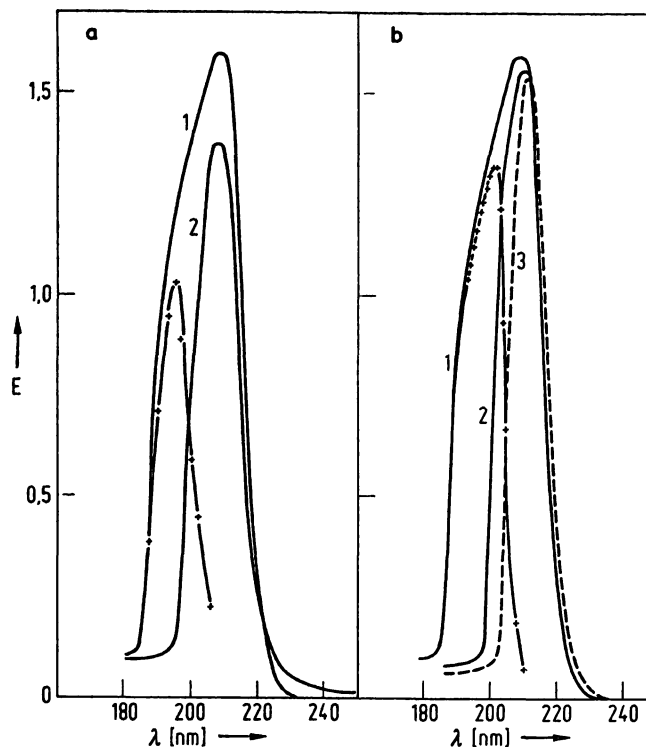


Abb. 4. Absorptionsspektren von 1,0 mmol/l Kreatin bei pH 2,0 (Abb. 4 a, Kurve 2) und bei zunehmender Ionenstärke (Abb. 4 b, Kurven 2 und 3) im Vergleich mit Kreatin in bidest. Wasser (jeweils Kurve 1). Aus den Kurven 1 und 2 bzw. 1 und 3 ergeben sich die entsprechenden Differenzspektren (+—+) mit einem Absorptionsmaximum bei 196 nm bzw. 201–202 nm.

Abb. 4 a. Spektrum 1: H_2O
Spektrum 2: pH2

Abb. 4 b. Spektrum 1: H_2O
Spektrum 2: NaCl, 0,1 mmol/l
Spektrum 3: NaCl, 1,0 mmol/l

durch ein starkes, aber nicht vollständiges Überlappen der Absorptionsbanden von 2 verschiedenen Chromophoren zustandekommen könnte. Eine Zunahme der H^+ -Konzentration oder Ionenstärke bringt diese Asymmetrie z.B. bei Kreatin (Abb. 4) völlig zum Verschwinden. Aus den Differenzspektren ließ sich eine zweite Absorptionsbande mit einem Maximum bei etwa 202 nm ermitteln, dessen Lage gut mit der A-Bande von Kreatinin und Glykocyamidin übereinstimmt (vgl. Tab. 1). In Anbetracht der gleichartigen Hypochromie der A-Bande von Kreatinin und Glykocyamidin (Abb. 2, Tab. 2, 3 a, b) erscheint die Schlußfolgerung zulässig, daß auch Kreatin zwei Chromophore besitzt, deren Nachweis nur indirekt erfolgen kann. Ähnliches gilt für andere Guanidine und Hydantoine mit asymmetrischen Absorptionsbanden.

Diskussion

Kreatinin läßt sich an Hand seiner spektralen Absorptionseigenschaften sowohl identifizieren als auch quantitativ bestimmen; das gleiche gilt für Kreatin und Kreatinphosphat nach vorheriger Umformung zu Kreatinin (2,13,14,15). Die Beobachtung einer Doppelbande im

Tab. 4. Spektrale Absorption der von Harnstoff abgeleiteten Hydantoinanalogen.

Substanz 1,0 mmol/l	pH	λ_{\max}	$\epsilon_{\max} (\times 10^6)$ [cm ² /mol]
Harnstoff	6,5*	191	0,60
Hydantoinensäure	3,5*	195	0,95
Hydantoinensäure	7,0	199	1,04
Hydantoin	4,7*	212	1,56
5-Methylhydantoin	6,5*	212	1,44
5-Methylhydantoin	1,0**	212	1,42
5-Methylhydantoin	7,0	212	1,48
5-Methylhydantoin	12,5**	232	1,76
1-Methylhydantoin	5,6*	221	1,64
1-Methylhydantoin	0,9**	223	1,67
1-Methylhydantoin	7,0	224	1,69
1-Methylhydantoin	12,9**	243	1,86

* pH der Lösungen ohne Korrektur der H^+ -Konzentration.

** Substanzen in 0,1 mol/l HCl bzw. NaOH gelöst.

Absorptionsspektrum von Kreatinin (4) machte es erforderlich, die molekularen Voraussetzungen für das Zustandekommen dieses Spektrums eingehender zu bestimmen, um damit eine sichere Grundlage für eine allgemeinere Anwendung spektralphotometrischer Messungen von Guanidinverbindungen und ihre Interpretation zu schaffen.

Sowohl die Harnstoff- als auch die Carboxyl- bzw. Säureamidgruppe sind als Chromophore geringer Spezifität und Intensität bekannt. Sie erlauben energiereiche Übergänge vorwiegend einsamer Elektronenpaare mit Absorptionsbanden zwischen 180 und 220 nm (9,16). Auch die Guanidgruppe ist offensichtlich dieser Kategorie von Chromophoren zuzurechnen. Sie konnte als Bestandteil verschiedener offenkettiger und zyklischer Guanidinverbindungen an ihrer spektralen Reaktion gegenüber Veränderungen der H^+ -Konzentration und Ionenstärke als eigenständiger Chromophor erkannt werden, der sich auf diese Weise nicht nur von der Carboxyl- und Säureamidgruppe, sondern auch von der Harnstoffgruppe analoger Hydantoinmoleküle abgrenzen ließ. Schlüssig sind hier die Beobachtungen, daß nur bei den Guanidinverbindungen die Bedingungen, die zu einer Zunahme der Protonierung basischer Gruppen führten, eine selektive Hypochromie im kürzerwelligen Bereich des Absorptionsspektrums zur Folge hatten. Dieses Verhalten erinnert an die Modellsubstanz Anilin, bei der eine Zunahme der Protonierung der Aminogruppe ebenfalls eine typische Doppelbande im Absorptionsspektrum zum Verschwinden bringt (9,17). Diese Effekte lassen sich damit erklären, daß die Protonierung der Amino- bzw. der Iminogruppe die Resonanzfähigkeit von π -Elektronen und damit die für die Lichtabsorption erforderlichen Elektronenübergänge unterbindet (10).

Insgesamt waren die Absorptionsintensitäten der erwähnten Chromophore, einschließlich der zyklischen Hydantoinen gering und ihre spektralphotometrische Differenzierung ohne Anwendung besonderer Maßnahmen nicht möglich, da die Absorptionsbanden im gleichen spektralen Bereich auftreten und sich gegenseitig verdecken. Ihr Vorhandensein war allerdings bei den hier untersuchten Beispielen aus der Asymmetrie der Absorptionskurven deutlich zu entnehmen. Eine Ausnahme hiervon machen die zyklischen Guanidine, von denen bisher nur Glykocyamidin und Kreatinin untersucht wurden.

Mit der Lactambildung aus Glykocyamin bzw. Kreatin treten zwei wichtige Veränderungen in der spektralen Absorption dieser Substanzen auf. Die selektive Rotverschiebung des Säureamidchromophors, die die Doppelbande im Spektrum der Lactame gut abgesetzt erscheinen läßt, weist zusammen mit der Intensitätszunahme auf eine Verlängerung des Chromophors und eine Zunahme des Absorptionsquerschnittes durch den Ringschluß hin. Gleichzeitig entsteht ein konjugiertes System, denn die Absorptionsintensitäten von Glykocyamidin und insbesondere von Kreatinin erreichen die für ein

solches System typischen Extinktionswerte. Der deutliche Unterschied zwischen der Absorptionsintensität von Glykocyamidin und Kreatinin ist auf die Wirkung der elektronenschiebenden N_1 -Methylsubstitution zurückzuführen. Die anregbaren Elektronen erreichen so den höchsten Grad der Resonanzfähigkeit im Kreatinin, das Molekül den höchsten Grad der Stabilität, und zwar in der nichtionisierten Form, denn das Maximum der Absorption der Guanidinbande von Kreatinin fällt in den pH-Bereich von 7–10, in dem die Dissoziation des Guanidiniumions praktisch vollständig ist.

Nach dem spektralen Verhalten der B-Bande von Kreatinin zu urteilen, besteht in diesem Bereich auch ein ausgeglichenes Gleichgewicht in der Keto-Enolautomerie von Kreatinin (18) bzw. in der ebenfalls möglichen Lactam-Lactimautomerie, die dem Resonanzsystem der Säureamidgruppe zugrundeliegen. Dabei bildet die Enolform ein für die Absorptionsintensität wohl günstigeres aromatisches System zu den mesomeren Elektronen der Guanidgruppe. Rotverschiebung und Zunahme der Intensität der B-Bande beim Übergang von pH 4 nach pH 5–6 deuten an, daß sich hierbei der Umschlag des tautomeren Gleichgewichtes der Säureamidgruppe vollzieht. Im stärker sauren Bereich überwiegt dagegen die Enolform mit gleichzeitiger Protonierung am Sauerstoffatom. Tatsächlich ließen sich Kreatinin (4) und Glykocyamidin (unveröffentlicht) in salzsaurer Lösung (10 mmol/l in 100 mmol/l HCl) dünnschichtchromatographisch auf Cellulose in sauren Laufmittelsystemen in zwei etwa gleich große Fraktionen mit unterschiedlichen R_F -Werten auftrennen. Die gleichen Substanzen in neutraler Lösung ergaben unter sonst gleichen Bedingungen je eine einheitliche Bande. Worin liegt die prospektive Bedeutung der Ergebnisse dieser Untersuchung? Im Gegensatz zu den Angaben früherer Untersucher (1,2) weisen auch offenkettige Guanidine, einschließlich Kreatinphosphat, eine niedrige, doch typische Absorptionsbande auf. Die Doppelbande im Spektrum der zyklischen Guanidine Kreatinin und Glykocyamidin erhöht die Spezifität ihrer spektralphotometrischen Identifizierung. Anhand der Absorptionsspektren von Guanidinverbindungen können nunmehr im Gegensatz zu titrimetrischen Methoden Aussagen über die Dissoziationsverhältnisse auch in komplex zusammengesetzten Lösungen gemacht werden, sofern im Leerwert andere bei dieser Wellenlänge absorbierende Substanzen berücksichtigt werden. Die selektive, spektralphotometrisch erfaßbare Beeinflussung des Guanidiniumions durch die Ionenstärke des Lösungsmediums erlaubt bereits jetzt Rückschlüsse auf den Ladungszustand dieser Moleküle im Organismus. In Anbetracht der vergleichbaren Ionenstärken physiologischer Körperflüssigkeiten liegt Kreatinin sehr wahrscheinlich auch bei physiologischem pH nicht als neutrales Molekül, sondern zu einem erheblichen Teil, wenn nicht vollständig als Kation vor. Verstärkt wird dieser Effekt noch durch die spezifische Wirkung bestimmter organischer Carbonsäuren auf die

Dissoziation von Kreatinin (4). Kationisches Kreatinin könnte als Vehikel für die Bindung von Wasserstoffionen, sei es im Gewebe, sei es im Harn, eine quantitativ wichtige Rolle spielen. Ähnliches gilt für Kreatin, das bei Dissoziation der Carboxylgruppe im Organismus als bipolares, insgesamt jedoch isoelektrisches Molekül aufzufassen ist. Diese Zusammenhänge sind für den Austausch niedermolekularer Stoffe an biologischen Membranen durch einfache Diffusion oder spezifische Transportmechanismen wichtig, denn hierbei spielt der Ladungszustand der Moleküle eine Rolle (19). Im übrigen legt das spektralphotometrische Verhalten von Kreatin unter dem

Einfluß zunehmender Dissoziation die Vermutung nahe, daß die basische Guanidingruppe ähnlich wie bei Kreatinin bereits im Neutralpunkt vollständig dissoziiert ist. Ältere Angaben über ein pK' der Guanidingruppe von etwa 14 (17) bedürfen deswegen einer Überprüfung.

Danksagung

Fräulein I. Bonsmann sind wir für hervorragende technische Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

1. Grinbaum, R. & Marchlewski, L. (1937), Bull. Intern. Acad. Polon. Classe Sci. Math. Nat. Sér. A, 156–170.
2. Gaede, K. & Grüttner, R. (1952), Naturwissenschaften 39, 63–65.
3. Wollenberger, A. (1953), Acta Chem. Scand. 7, 445–446.
4. Berlet, H. H. (1974), diese Z. 12, 48–49.
5. Ware, E. (1950), Chem. Rev. 46, 403–470.
6. Rosenberg, H., Ennor, A. H. & Morrison, J. F. (1956), Biochem. J. 63, 153–159.
7. Brenner, M., Niederwieser, A. & Pataki, G. (1967), In Dünnschichtchromatographie (Stahl, E., Hrsg.), 2. Aufl., S. 696–749, Springer-Verlag, Berlin.
8. Fishbein, L. & Cavanaugh, M. A. (1965), J. Chromatogr. 20, 283–294.
9. Williams, D. H. & Fleming, I. (1971), Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 2. Aufl., S. 6–40, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
10. Pauling, L. (1964), Die Natur der chemischen Bindung. 2. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße.
11. Cannan, R. K. & Shore, A. (1928), Biochem. J. 22, 920–929.
12. Failey, C. F. & Brand, E. (1933), J. Biol. Chem. 102, 767–771.
13. Adams, W. S., Davis, F. W. & Hansen, L. E. (1962), Anal. Chem. 34, 854–856.
14. Adams, W. S., Davis, F. W. & Hansen, L. E. (1964), Anal. Chem. 36, 2209–2211.
15. Wollenberger, A. (1954), Nature (London) 173, 205–207.
16. Edsall, J. T. (1943), in Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions (Cohn, E. J. & Edsall, J. T., Hrsg.), S. 9–19, Reinhold Publishing Corporation, New York.
17. Edsall, J. T. (1943), in Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions (Cohn, E. J. & Edsall, J. T., Hrsg.), S. 116–139, Reinhold Publishing Corporation, New York.
18. Greenwald, I. & Gross, J. (1924), J. Biol. Chem. 59, 601–612.
19. Netter, H. (1959), Theoretische Biochemie, S. 668–735, Springer-Verlag Berlin.

Prof. Dr. H. Berlet
Pathol. Inst. d. Univ.
6900 Heidelberg
Im Neuenheimer Feld 220–221

